

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 พืชทดลอง

ต้นสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) สายพันธุ์ พัทลุง โดยใช้ชิ้นส่วนยอดที่เกิดจากตาข้าง ก้านใบ ใบ และยอดจากต้น

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

1.2.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร

- MS (Murashige and Skoog, 1962)
- Agar Powder, Bacteriological (Himedia, India)
- น้ำตาลซูโครส (sucrose)

1.2.2. สารควบคุมการเจริญเติบโต

- N⁶-benzyladenine (BA)
- Indole-3-butylic acid (IBA)
- Phluroglucinol (PG)

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- คลอโรกซ์ [Clorox (5.25% NaOCl)]
- Tween 20

1.4 อุปกรณ์

1.4.1 อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เตาไฟฟ้า (hot plate)
- ตู้อบไมโครเวฟ (microwave)
- ช้อนตักสารเคมี
- บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ

- ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาดต่าง ๆ
- แท่งแก้ว
- กระจกทวง
- ปีเปตต์
- ขวดใส่อาหารขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาปิด

1.4.2 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับตัดถ่ายเนื้อเยื่อ

- ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อพีช (lamina air flow)
 - ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - ขวดแช่เครื่องมือ
 - เครื่องแก้ว: จานแก้ว ขวดรูปชมพู่ และขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์
 - เครื่องมือผ่าตัด: ค้อนมิด (เบอร์ 4 และ 7) ไขมิด (เบอร์ 11 และ 24)
- ปากกีสบ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2. วิธีการทดลอง

2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดทวิคูณจากยอดที่เกิดจากตาข้างของสไปด้า

นำข้อของสไปด้าจากต้นที่มีอายุ 2 ปี มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยล้างข้อด้วยน้ำยาล้างจานและล้างน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอโรกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่มี Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 15 และ 10 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วนำข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้มีขนาดประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร เลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร MS ประมาณ 7 วัน จนเกิดยอดจากตาข้างและมีใบประมาณ 1-2 ใบ ตัดยอดให้มีขนาดความสูงประมาณ 0.7 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ รวมทั้งหมด 10 สูตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ IBA ในอาหารแข็งสูตร MS

สำหรับการชักนำการเกิดยอดทวิคูณจากยอดที่เกิดจากตาข้างของสไปด้า

| สูตร MS | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (μM) | |
|---------|---|-------|
| | BA | IBA |
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0.44 | 0 |
| 3 | 2.22 | 0 |
| 4 | 2.22 | 0.049 |
| 5 | 4.44 | 0 |
| 6 | 4.44 | 0.049 |
| 7 | 4.44 | 0.49 |
| 8 | 8.88 | 0 |
| 9 | 8.88 | 0.049 |
| 10 | 8.88 | 0.49 |

อาหารสูตรทดลองทั้งหมดเติมวุ้น 6.2 กรัมต่อลิตร (Agar of Himedia, India) น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.7 ± 0.01 [ปรับด้วย Potassium hydroxide (KOH)]

ความเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือ Hydrochloric acid (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล] นิ่งฆ่าเชื้อด้วย
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ทำการทดลอง 8 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรส
เซนส์ที่มีความเข้มแสงประมาณ $30\text{-}35 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2
องศาเซลเซียส

บันทึกการเจริญเติบโตของยอดจากตาข้าง โดยการนับจำนวนยอดและจำนวนใบที่เกิดขึ้น
หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's new
multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดทวิคูณจากชิ้นส่วนก้านใบของสบู่ดำ

นำก้านใบจากข้อที่ 2, 3 และ 4 ของต้นสบู่ดำที่มีอายุ 2 ปี มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยล้างก้านใบด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่มี Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 15 และ 10 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วนำก้านใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BA ความเข้มข้น 0-17.76 μM ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0-9.80 μM รวมทั้งหมด 36 สูตร (ตารางที่ 4) โดยแบ่งรอบการเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 รอบการเพาะเลี้ยงคือ รอบการเพาะเลี้ยงที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนก้านใบ เป็นเวลา 30 วัน รอบการเพาะเลี้ยงที่ 2 การชักนำให้เกิดยอดทวิคูณจากแคลลัสของชิ้นส่วนก้านใบ เป็นเวลา 30 วัน

อาหารสูตรทดลองทั้งหมดเติมวุ้น 6.2 กรัมต่อลิตร (Agar of Himedia, India) น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.7 ± 0.01 (ปรับด้วย KOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือ HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ $30\text{-}35 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

บันทึกการเจริญเติบโตของก้านใบที่ 2, 3 และ 4 ในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 1 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน และในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 2 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยรอบการเพาะเลี้ยงที่ 1: วัดเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดขึ้นต่อชิ้นเนื้อเยื่อและนับจำนวนตายอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นเนื้อเยื่อ รอบการเพาะเลี้ยงที่ 2: นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นและจำนวนใบที่เกิดในแต่ละยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ ($P = 0.10$) สำหรับการเกิดแคลลัส และที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P = 0.05$) สำหรับการเกิดยอดของก้านใบของใบจากข้อที่ 2, 3 และ 4

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ IBA ในอาหารแข็งสูตร MS สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดทิวจากชิ้นส่วนก้านใบของสนุ่นดำ

| สูตร MS | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (μM) | |
|---------|---|-------|
| | BA | IBA |
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0.049 |
| 3 | 0 | 0.49 |
| 4 | 0 | 2.46 |
| 5 | 0 | 4.90 |
| 6 | 0 | 9.80 |
| 7 | 0.44 | 0 |
| 8 | 0.44 | 0.049 |
| 9 | 0.44 | 0.49 |
| 10 | 0.44 | 2.46 |
| 11 | 0.44 | 4.90 |
| 12 | 0.44 | 9.80 |
| 13 | 2.22 | 0 |
| 14 | 2.22 | 0.049 |
| 15 | 2.22 | 0.49 |
| 16 | 2.22 | 2.46 |
| 17 | 2.22 | 4.90 |
| 18 | 2.22 | 9.80 |
| 19 | 4.44 | 0 |
| 20 | 4.44 | 0.049 |
| 21 | 4.44 | 0.49 |
| 22 | 4.44 | 2.46 |
| 23 | 4.44 | 4.90 |
| 24 | 4.44 | 9.80 |
| 25 | 8.88 | 0 |
| 26 | 8.88 | 0.049 |
| 27 | 8.88 | 0.49 |
| 28 | 8.88 | 2.46 |
| 29 | 8.88 | 4.90 |
| 30 | 8.88 | 9.80 |
| 31 | 17.76 | 0 |
| 32 | 17.76 | 0.049 |
| 33 | 17.76 | 0.49 |
| 34 | 17.76 | 2.46 |
| 35 | 17.76 | 4.90 |
| 36 | 17.76 | 9.80 |

2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดทวิคูณจากชิ้นส่วนใบของสบู่ดำ

นำใบจากข้อที่ 2 และ 3 ของต้นสบู่ดำที่มีอายุ 2 ปี มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยล้างใบด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และ ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่มี Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 15 และ 10 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วนำไปที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BA และ IBA ความเข้มข้น 0-17.76 μM ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0-9.80 μM รวมทั้งหมด 36 สูตร (ตารางที่ 5) โดยแบ่งรอบการเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 รอบการเพาะเลี้ยงคือ รอบการเพาะเลี้ยงที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ เป็นเวลา 30 วัน รอบการเพาะเลี้ยงที่ 2 การชักนำให้เกิดยอดทวิคูณจากแคลลัสของชิ้นส่วนใบ เป็นเวลา 30 วัน

อาหารสูตรทดลองทั้งหมดเติมวุ้น 6.2 กรัมต่อลิตร (Agar of Himedia, India) น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.7 ± 0.01 (ปรับด้วย KOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือ HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ทำการทดลอง 18 ชุด ๆ ละ 1 ขวดจากชิ้นส่วนใบที่ 2 และทำการทดลอง 20 ชุด ๆ ละ 1 ขวดจากชิ้นส่วนใบที่ 3 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ $30-35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

บันทึกการเจริญเติบโตของใบจากข้อที่ 2 และ 3 ในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 1 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน และในรอบการเพาะเลี้ยงที่ 2 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน โดยรอบการเพาะเลี้ยงที่ 1: วัดเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดขึ้นต่อชิ้นเนื้อเยื่อและนับจำนวนตายอดที่เกิดขึ้นต่อชิ้นเนื้อเยื่อ รอบการเพาะเลี้ยงที่ 2: นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นและจำนวนใบที่เกิดในแต่ละยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซ็นต์ ($P = 0.10$) สำหรับการเกิดแคลลัส และที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P = 0.05$) สำหรับการเกิดยอดของใบจากข้อที่ 2 และ 3

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ IBA ในอาหารแข็งสูตร MS สำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดทิวจากชิ้นส่วนใบของสนุ่นดำ

| สูตร MS | ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (μM) | |
|---------|---|-------|
| | BA | IBA |
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0.049 |
| 3 | 0 | 0.49 |
| 4 | 0 | 2.46 |
| 5 | 0 | 4.90 |
| 6 | 0 | 9.80 |
| 7 | 0.44 | 0 |
| 8 | 0.44 | 0.049 |
| 9 | 0.44 | 0.49 |
| 10 | 0.44 | 2.46 |
| 11 | 0.44 | 4.90 |
| 12 | 0.44 | 9.80 |
| 13 | 2.22 | 0 |
| 14 | 2.22 | 0.049 |
| 15 | 2.22 | 0.49 |
| 16 | 2.22 | 2.46 |
| 17 | 2.22 | 4.90 |
| 18 | 2.22 | 9.80 |
| 19 | 4.44 | 0 |
| 20 | 4.44 | 0.049 |
| 21 | 4.44 | 0.49 |
| 22 | 4.44 | 2.46 |
| 23 | 4.44 | 4.90 |
| 24 | 4.44 | 9.80 |
| 25 | 8.88 | 0 |
| 26 | 8.88 | 0.049 |
| 27 | 8.88 | 0.49 |
| 28 | 8.88 | 2.46 |
| 29 | 8.88 | 4.90 |
| 30 | 8.88 | 9.80 |
| 31 | 17.76 | 0 |
| 32 | 17.76 | 0.049 |
| 33 | 17.76 | 0.49 |
| 34 | 17.76 | 2.46 |
| 35 | 17.76 | 4.90 |
| 36 | 17.76 | 9.80 |

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงขลาวิทยาเขต

2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากจากส่วนยอดของสับปุดำ

นำยอดของสับปุดำจากต้นที่มีอายุ 2 ปี มาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยล้างข้อด้วยน้ำยาล้างจาน และล้างน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่มี Tween 20 ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 15 และ 10 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วนำยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมา ตัดให้มีขนาดประมาณ 1.0-2.0 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Basal Rooting Medium (BRM) ซึ่งประกอบด้วย อาหารแข็งครึ่งสูตรของ MS ที่มี PG ความเข้มข้น 793 ไมโครโมลาร์ และเติม IBA ความเข้มข้น 0-490.0 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งมีอาหารทั้งหมด 7 สูตร และ 16 วิธี โดยที่ ระยะเวลาในการเลี้ยงบนสูตรอาหาร BRM แตกต่างกัน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 วิธีการและความเข้มข้นของ IBA ในอาหารแข็งสูตร BRM สำหรับการชักนำให้เกิดรากของยอดสับปุดำ

| วิธีที่ | สูตร | ความเข้มข้น IBA (μM) | เวลาที่ใช้ในการเลี้ยง | |
|---------|------|--------------------------------------|-----------------------|-----|
| | | | บน BRM+IBA | BRM |
| 1 | 1 | 0 | 30 | 0 |
| 2 | 2 | 2.46 | 30 | 0 |
| 3 | 3 | 4.90 | 30 | 0 |
| 4 | 4 | 9.80 | 30 | 0 |
| 5 | 5 | 24.46 | 1 | 29 |
| 6 | 5 | 24.46 | 3 | 27 |
| 7 | 5 | 24.46 | 6 | 24 |
| 8 | 5 | 24.46 | 15 | 15 |
| 9 | 6 | 49.00 | 1 | 29 |
| 10 | 6 | 49.00 | 3 | 27 |
| 11 | 6 | 49.00 | 6 | 24 |
| 12 | 6 | 49.00 | 15 | 15 |
| 13 | 7 | 490.00 | 1 | 29 |
| 14 | 7 | 490.00 | 3 | 27 |
| 15 | 7 | 490.00 | 6 | 24 |
| 16 | 7 | 490.00 | 15 | 15 |

อาหารสูตรทดลองทั้งหมดเติมวุ้น 6.2 กรัมต่อลิตร (Agar of Himedia, India) น้ำตาลซูโครส 15 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.7 ± 0.01 (ปรับด้วย KOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือ HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสงประมาณ $30\text{-}35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

บันทึกระยะเวลาเริ่มต้นที่เกิดราก จำนวนราก และความยาวรากที่เกิดขึ้น หลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 30 วัน แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ($P = 0.01$)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์